



TITLE:

Site-specific chemical modification of mitochondrial respiratory complex I (Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Masuya, Takahiro

CITATION:

Masuya, Takahiro. Site-specific chemical modification of mitochondrial respiratory complex I. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20418>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	梶 谷 貴 洋
論文題目	Site-specific chemical modification of mitochondrial respiratory complex I (ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の位置特異的的化学修飾に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>H⁺輸送性NADH-キノン酸化還元酵素 (呼吸鎖複合体 I) は、ミトコンドリアやバクテリアの呼吸鎖酵素系の初発酵素であり、基質の酸化還元反応と共役したH⁺輸送を行う膜タンパク質複合体である。2013年に報告された好熱細菌 (<i>Thermus thermophilus</i>) 複合体 I のX線結晶構造 (3.3Å) から、本酵素のH⁺輸送活性には膜ドメインの大きな構造変化が伴うことが示唆されたが、これを支持する直接的証拠は得られていない。本論文では、1分子計測によって複合体 I の構造変化を直視することを将来的な目標に見据え、可視化するためのプローブ分子を複合体 I に導入することを可能にする化学的足場を築くために、酵素に対して位置特異的に化学修飾する方法論の確立を目指した。本論文の成果は以下の3項目に要約される。</p>			
<p>1) タンパク質化学修飾法の一つであるligand-directed tosyl chemistry (トシル化学) に着目し、複合体 I の位置特異的な化学修飾を試みた。トシル化学とは、リガンド分子の持つ高い結合親和性を利用して、リガンド分子内に組み込んだタグを標的タンパク質内の求核性アミノ酸残基との置換反応によって固定させるものである。本論文ではリガンド分子として、複合体 I の強力な阻害剤であるアセトゲニンを選び、タグとして末端アルキンもしくはアジド基を組み込んだAL1およびAL2をそれぞれ合成した。両リガンド分子は、アルキンあるいはアジド基を酵素に導入し、ここに2次タグとなる蛍光色素やビオチンなどをクリックケミストリーによって結合させて蛍光イメージングやペプチド化学分析に活用することを意図して分子設計した。</p> <p>ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子 (SMP) を実験材料とし、AL1あるいはAL2を用いて複合体 I に対してトシル化学を実施した。各種プロテアーゼによる限定消化後のペプチドマッピングおよびLC-MS解析の結果、キノン結合ポケットの最深部を構成する49 kDaサブユニットの160番目のアスパラギン酸 (49 kDa-Asp160) が特異的にアルキン化 (AL1の場合) あるいはアジド化 (AL2の場合) されることを明らかにした。</p>			
<p>2) 大きな歪みをもつ環状アルキンは、銅触媒を用いることなくアジド基と直接的に反応する。この反応を利用して、49 kDa-Asp160をアジド化した (Asp160-N₃) 複合体 I が、キノン結合ポケットよりも嵩高い歪んだ環状アルキン (TAMRA-DIBO) と反応するかどうかを調べ、同ポケットの構造特性を検討した。好熱細菌複合体 I の結晶構造を参照すると、キノン結合ポケットは入口の内径約8Å、奥行き約30Åの細長い空間を形成しており (“洞窟モデル”)、内径よりも大きな分子であるTAMRA-DIBOが最深部に位置するAsp160-N₃に接近することは不可能なはずである。しかし、</p>			

TAMRA-DIBOはAsp160-N₃と直接的に反応し、過剰量の他の阻害剤や人工キノンの共存下でもこの反応は抑制されなかった。この結果から、キノン結合ポケットは“洞窟モデル”で説明できるほど単純なものではなく、嵩高く多様な構造を持つリガンド分子を収容できる高い柔軟性を持つことが強く示唆された。

- 3) 好熱細菌複合体 I の結晶構造に基づくQM/MM分子動力学シミュレーションによると、49 kDa-Asp160は隣接するヒスチジン残基 (His59) とイオンペアを形成することがキノン還元反応において必須であることが示唆されている。そこで、タグとしてメチル基を有するALMを合成し、49 kDa-Asp160を特異的にメチル化 (メチルエステル化) することで、酵素の機能発現におけるAsp160の役割を調べた。まずSMP中のインタクトな複合体 I をALMによるトシル化学に供したところ、49 kDa-Asp160が特異的にメチル化されることが確認された。次に、49 kDa-Asp160のメチル化によって酵素が完全に失活するという前提に立って、メチル化率と酵素の残存活性の関係を精査したところ、メチル化の程度から予想されるよりもかなり高い残存活性が認められた。このことから、49 kDa-Asp160は複合体 I の活性に一定の寄与はしているものの、必須ではないことが明らかになった。

さらに、49 kDa-Asp160のメチル化がキノン結合ポケットの構造に与える影響を調べるため、49 kDaサブユニットを特異的に修飾する光反応性キナゾリン ([¹²⁵I]AzQ) との反応効率の変化を検討した。メチル化された複合体 I を [¹²⁵I]AzQによって光親和性標識したところ、その反応効率はメチル化の程度に関わらず、未修飾 (コントロール) の複合体 I と同程度であることがわかった。この結果から、49 kDa-Asp160のメチル化は、キノン結合ポケットの構造にほとんど影響をおよぼさないことが明らかになった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

呼吸鎖複合体 I は、ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素となる膜タンパク質複合体である。本酵素は合成農薬や抗寄生虫薬の創薬標的となることから、その基礎研究の大幅な進展が期待されている。最近の構造生物学的研究の成果により、複合体 I の概観は明らかになりつつあるものの、その作動メカニズムの詳細に関しては未だに不明な点が多い。本論文は、複合体 I 研究において斬新な研究方法論を確立するべく、同酵素の反応機構の解明に有機化学的手法を用いて取り組んだもので、評価すべき点は以下の通りである。

- 1) トシル化学法を利用して、複合体 I のキノン結合ポケットの最深部を構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 (49 kDa-Asp160) を特異的にアルキン化あるいはアジド化する方法を確立した。
- 2) インタクトな複合体 I の 49 kDa-Asp160 に導入したアジド基は、非常に嵩高い TAMRA-DIBO と直接的に反応でき、この反応は他の阻害剤の存在下でも抑制できないことを示した。この事実から、キノン結合ポケットは提唱されている“洞窟モデル”で示されるような狭い空間ではなく、多様な構造を持つリガンド分子を収容できる柔軟性の高い空間であることが強く示唆された。
- 3) キノンの還元反応に必須のアミノ酸残基だと考えられてきた 49 kDa-Asp160 をトシル化学によってメチル化しても、酵素活性は完全には失活しなかった。この結果から、49 kDa-Asp160 は酵素の機能に一定の寄与はしているものの、必ずしも必須ではないことが明らかになった。

以上のように本論文は、呼吸鎖複合体 I の特異的化学修飾を可能にする方法論を初めて確立すると同時に、有機化学的なアプローチによってキノン結合ポケットの構造や機能の特性を明らかにした。一連の研究成果は、生物有機化学、農薬科学および生化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 29 年 1 月 16 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）